

氏名(本籍)	と やま たか し 外 山 喬 士 (茨城県)			
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	博 甲 第 5914 号			
学位授与年月日	平成 23 年 7 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	<b>Protective Effect of Keap1-Nrf2 System against Methylmercury Toxicity through Reduction of Its Accumulation</b> (Keap1-Nrf2 システムによるメチル水銀の毒性軽減効果)			
主査	筑波大学教授	理学博士	石 井 哲 郎	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	石 井 一 弘	
副査	筑波大学講師	博士(理学)	小 林 麻己人	
副査	筑波大学講師	博士(農学)	蕨 栄 治	

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

環境化学物質であるメチル水銀 (MeHg) は、魚介類を通しヒトに蓄積し、蓄積量が多い場合には胎児への神経発育阻害などを引き起こすことが指摘されている。これまでの研究から、MeHg の生体への蓄積量はその健康リスクと相関することが明らかとなっているので、本研究では、MeHg の解毒・排泄の調節に注目し、異物代謝系第 2 相酵素群を統括的に発現制御する、Keap1-Nrf2 系の働きと MeHg の蓄積量と生体毒性との関連について検討し、Nrf2 活性化剤である植物由来イソチオシアネートの防御効果の有無を培養細胞とマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

### (対象と方法)

培養細胞は、ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y とマウス初代肝細胞を用いた。また、動物実験では 6-10 週令の雄性マウスを用いた。タンパク質の発現量はウエスタンブロット法、MeHg の細胞毒性は MTT 法、水銀量の測定は原子吸光法、細胞内グルタチオン量は HPLC-ECD により測定した。タンパク質に対する MeHg の結合はビオチンマレイミドラベル法あるいは同沈降法と MALDI-TOF/MS により分析した。

### (結果)

細胞を MeHg で処理すると、細胞内 Nrf2 の発現量が増加し解毒代謝酵素群の発現上昇を引き起こした。Nrf2 活性化の仕組として細胞内で MeHg が Keap1 の Cys151 へ結合することを示した。siRNA により Nrf2 の発現を抑制した場合、MeHg の毒性は有意に増加し、一方、イソチオシアネートにより Nrf2 の発現量を増強した場合には MeHg の細胞内蓄積量および細胞毒性は軽減された。Nrf2 遺伝子欠損マウスに MeHg を投与すると、野生型と比較し、臓器に水銀が蓄積しやすく、水銀中毒症状を示し、死亡率に差が出た。また、イソチオシアネートをマウスに前処理したところ、投与した MeHg の臓器内蓄積と生体毒性が抑制された。

### (考察)

Nrf2 の発現量を siRNA で抑制する実験、Nrf2-KO マウス由来初代肝細胞、及びイソチオシアネート類による Nrf2 発現亢進の実験結果から、Keap1-Nrf2 システムは MeHg の解毒応答に重要であることを証明した。

さらに、イソチオシアネート類のマウスへの前投与により、各臓器への水銀蓄積が軽減され、中毒症状が抑制されることから、ワサビ等のアブラナ科植物の摂食は、MeHg 排泄に寄与する可能性が考えられた。以上の結果は、Nrf2 活性化を介する MeHg の排泄促進と毒性軽減についてヒトへの介入研究の先駆けとなるものである。

### 審査の結果の要旨

本研究は、メチル水銀の排泄促進と毒性軽減にイソチオシアネート類による Nrf2 の活性化が有効であることを培養細胞とマウス個体で証明した研究であり、優れた研究成果であると評価できる。

平成 23 年 6 月 7 日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。